

324
48.362

E600-TAM-P

F

UNIVERSITÉ DE RENNES I
U.F.R. MÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES


LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
ET IMMUNOLOGIE

DES PLASMIDES BACTÉRIENS
EN MILIEU MARIN

Z. TAMANAI-SHACOORI, M. ARTURO, C. MAMEZ
et
M. CORMIER

DÉPARTEMENT ENVIRONNEMENT
LITTORAL ET GESTION DU MILIEU
MARIN

1992

IFREMER-DERO/EL

OEL04522

Contrat IFREMER/DERO/EL
n° 90/2430446

E600
TAM-P

UNIVERSITÉ DE RENNES I
U.F.R. MÉDICALES ET PHARMACEUTIQUES

LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
ET IMMUNOLOGIE

DES PLASMIDES BACTÉRIENS
EN MILIEU MARIN

Z. TAMANAI-SHACOORI, M. ARTURO, C. MAMEZ
et
M. CORMIER

1992

Contrat IFREMER/DERO/EL
n° 90/2430446

SOMMAIRE

ABREVIATIONS

INTRODUCTION

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

I.1. Souches de référence

I.2. Souches d'environnement

I.3. Plasmides utilisés

I.4. Milieux et tampons

II. METHODES

II.1. Prélèvements d'eaux

II.2. Sélection, identification et conservation des souches

II.3. Extraction d'ADN plasmidique

II.4. Electrophorèse en gel d'agarose

II.5. Analyse statistique

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude du contenu plasmidique

II. Etude d'évolution des plasmides

BIBLIOGRAPHIE

ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATB	: Antibiotique
BET	: Bromure d'éthidium
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra-acétique
j	: Jour
h	: Heure
Kb	: Kilobase
Md	: Mégadalton
Min	: Minute
RNase	: Ribonucléase
SDS	: Dodécylsulfate de sodium
Tris	: Tris-hydroxyméthyl-aminométhane
UV	: Ultraviolet

INTRODUCTION

Peu d'études ont été réalisées sur la distribution, le transfert et les fonctions des plasmides existants dans les bactéries de l'environnement (Smith, 1970 ; Glasman et al., 1981 ; Hada et Sizemore, 1981). Hada et Sizemore (1981) en faisant une étude comparative sur le nombre des plasmides contenus dans 440 isollements de *Vibrio* marins du Golfe de Mexico ont démontré que l'incidence des plasmides est plus importante dans des isollements marins des sites pollués, que dans des isollements marins de sites non contaminés. Par contre, Burton et al. en 1982, en travaillant dans une rivière de South Wales, n'ont pas trouvé de différence significative entre les sites pollués et ceux non pollués sur le pourcentage total des isollements contenant des plasmides ainsi que sur l'incidence des plasmides des souches non "*Pseudomonas* -like" provenant des mêmes endroits. La majorité (86%) des plasmides détectés ont une masse moléculaire entre 35 et 312 Md. Baya et al., 1986, ont fait une étude comparative entre 4 zones :

- 1) des eaux provenant d'une station qui reçoit surtout des déchets chimiques
- 2) des eaux proches de la station
- 3) des eaux océaniques contaminées par des rejets domestiques
- 4) des eaux propres utilisées comme contrôle .

Les résultats obtenus montrent que le nombre de bandes plasmidiques par souche dans les différentes zones diminue dès la zone 1 vers la zone 4.

L'objectif de notre travail est d'examiner dans un premier temps, le contenu plasmidique des souches d'*E.coli* venant des eaux brutes, eaux épurées et des eaux de la sortie de la station d'épuration de Morlaix. Et dans un deuxième temps, étudier l'évolution de ces plasmides dans l'environnement pendant différents temps de séjour.

La station d'épuration de Morlaix, est une station de traitement biologique. Elle comprend deux filières identiques de traitement qui fonctionnent en parallèle et qui comprennent chacune, après le traitement des effluents (dégrillage, dessablage, dégraissage), un décanteur primaire, un bassin d'aération (boues activées) et un décanteur secondaire. En fin de traitement, il existe un bassin de chloration (désinfection au dioxyde de chlore) qui fonctionne de Juin à Septembre.

Les débits d'effluents bruts arrivant à la station sont de l'ordre de 300m³/h. Trop importants, ils ne peuvent être admis en totalité dans la station : 30 à 40% des effluents bruts sont directement déversés dans l'estuaire par l'utilisation d'un by-pass situé en entrée de station. Les rejets effectués dans la rivière sont donc constitués d'un mélange d'eaux usées brutes d'origine ménagère, industrielle ou de ruissellement, d'eaux traitées et accidentellement des boues de la station.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL

I.1. Souches de référence :

Les souches d'*Escherichia coli* K12 utilisées sont citées dans le tableau 1.

Tableau 1

Souches	Caractéristiques	Références
HB101	pro, leu, thi, str, hsr, hsm, recA13, F ⁻	Boyer et Roulland-Dussoix (1969)
J5	his, lys, trp, recA	Yamagishi et al. (1969)

F⁻ : sex facteur

his, leu, lys, pro, trp : représentent les auxotrophies pour les acides aminés suivants : histidine, leucine, lysine, proline et triptophane

hsm : modification déficiente

hsr : restriction déficiente

recA : recombinaison déficiente chez *E.coli*

str : résistance à la streptomycine

thi : thiamine

I.2- Souches d'environnement

I.2.1- Souches testées pour leurs contenus plasmidiques

300 souches d'*E.coli* ont été isolées à partir de :

- l'eau brute
- l'eau épurée
- l'eau à 1Km de la sortie de la station dans la rivière de Morlaix

I.2.2- Souches utilisées dans l'étude d'évolution des plasmides

24 souches d'*E.coli* parmi les 200 souches isolées à partir de l'eau brute (B.) et de l'eau épurée (E.) sont utilisées pour la réalisation de l'étude d'évolution des plasmides dans l'environnement. Les caractéristiques de ces souches sont résumées dans le tableau 2 (a et b).

Tableau 2 (a)

Souches d'origine de l'eau brute	Nb de plasmides	Tailles des plus grandes bandes (Kb)	Résistances aux Antibiotiques
B5	1	23,67	Tic,Ap,Km,Tc,Tp,Sm,Su
B17	4	56-33	-
B22	1	23,6	Tic,Km,Sm,Su,Ap,Cm
B31	4	>56	Tp,Su
B36	2	>56	Tc,Su
B38	4	>56	Tic,Tc,Tp,Sm,Su,Ap,Cm
B42	4	>56	Tp,Su
B87	4	>56	Tp,Su
B88	3	>56	Tc,Su
B89	3	33	Tc,Sm
B92	4	>56	-
B94	1	33-23,6	Tic,Tc,Tp,Ap

Ap, Cm, Gm, Km, Sm, Su, Tic, Tp, représentent les abréviations pour des résistances à l'ampicilline, chloramphénicol, gentamycine, kanamycine, streptomycine, sulfamides, tétracycline, ticarcilline, triméthoprime. Les tailles des bandes plasmidiques sont déterminées par migration simultanée d'un marqueur de taille.

Tableau 2 (b)

Souches d'origine de l'eau épurée	Nb de plasmides	Tailles des plus grandes bandes (Kb)	Résistances aux Antibiotiques
E3	7	>56	-
E30	4	56	-
E33	8	>56	-
E42	3	>56	-
E47	5	>56	-
E51	3	>56	-
E53	6	>56	-
E60	2	23,6-9,4	Tc,Tp,Su
E69	9	33-23,6	Tic,Tc,Ap
E77	4,5	23,6	Tic,Tc,Sm,Su,Ap,Cm
E82	4	33-23,67	-
E102	3	56-33	-

Ap, Cm, Gm, Km, Sm, Su, Tic, Tp, représentent les abréviations pour des résistances à l'ampicilline, chloramphénicol, gentamycine, kanamycine, streptomycine, sulfamides, tétracycline, ticarcilline, triméthoprim. Les tailles des bandes plasmidiques sont déterminées par migration simultanée d'un marqueur de taille.

I.3- Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés sont rassemblés dans le tableau 3.

Tableau 3

Plasmides	Résistances aux Antibiotiques (ATB)	Poids moléculaire (Kb)
RP1	Tic,Tc,Sm,Km	56
R388	Su,Tp	33
pUB824	Cm	4

Cm : Chloramphénicol

Km : Kanamycine

Sm : Streptomycine

Su : Sulfamides

Tc : tétracycline

Tic : ticarcilline

Tp : Triméthoprim

I.4- Milieux

Les milieux de croissance liquides ou solides ont été préparés selon les recommandations des firmes par dissolution dans de l'eau distillée puis autoclavage pendant 20 min à la température de 120°C.

I.4.1- Milieux nutritifs

Les seuls milieux nutritifs utilisés dans cette étude sont les suivants :

- Milieu liquide : Bouillon Brain Heart Infusion, BHI, (Difco) : 37g/l
- Milieu solide : Gélose Mueller-Hinton, MH, (Difco) : 37g/l

I.4.2- Eaux

a) Eau brute et eau épurée

L'eau brute et l'eau épurée ont été prélevées à la station d'épuration de Morlaix le même jour au mois de Février 1991. La méthode de stérilisation choisie est une série de filtrations successives sur des membranes Millipore de 8 à 0,22 μ m. Ce système de filtration a l'avantage d'éliminer les bactéries et la matière organique particulaire sans modifier la matière organique dissoute.

L'eau brute préfiltrée 2 fois et l'eau épurée sont filtrées successivement sur des membranes Millipore (47mm) de porosité décroissante : 8 μ m, 3 μ m, 0,65 μ m, 0,45 μ m et 0,22 μ m. La veille et le jour de l'expérience, les eaux sont refiltrées 2 fois sur membranes Millipore 0,22 μ m pour éviter toute contamination possible.

b) Eau saumâtre

Les prélèvements d'eau saumâtre sont effectués à 2 dates différentes selon l'expérience à mettre en oeuvre : au mois de février 1991 pour les essais avec la souche de référence, et au mois de septembre 1991, pour ceux avec les souches de l'environnement.

Cette eau ayant un rapport de salinité de 38% a été prélevée à 1Km en aval de la station en début de jusant. Elle est filtrée sur membrane Millipore 0,22 μ m puis autoclavée à 110°C pendant 20 minutes.

II. METHODES

II.1- Prélèvements d'eaux pour la recherche des souches d'*E.coli*

Les souches d' *E.coli* faisant l'objet de cette étude ont été isolées :

- des eaux usées : eau brute et eau traitée de la station d'épuration de Morlaix (Finistère Nord, Bretagne)
- de l'eau en aval de la station en début de jusant

La station d'épuration est située en aval sur le bord des rivières citées auparavant. Elle reçoit des eaux usées urbaines et de la zone industrielle de Morlaix et des environs. Les eaux épurées par traitement biologique sont déversées directement dans la rivière. Les prélèvements sont réalisés par immersion d'un bidon de 5 litres préalablement désinfecté. Sitôt prélevés, les échantillons sont acheminés au laboratoire où ils sont conservés à 4°C avant que l'expérimentation soit mise en oeuvre.

Les prélèvements d'eau brute et d'eau épurée ont été réalisés le même jour (28 mai 1991) alors que ceux de l'eau saumâtre se sont étalés sur quatre périodes différentes de l'année 1991 (2 prélèvements en mai et juin et 2 prélèvements en juillet).

II.2- Sélection, identification et conservation des souches

Les échantillons d'eaux sont traités au laboratoire de façons différentes selon leur origine. L'eau épurée est filtrée sur membranes Millipore de porosité $3\mu\text{m}$ puis $0,22\mu\text{m}$, l'eau saumâtre uniquement sur $0,22\mu\text{m}$. L'eau brute est utilisée sans filtration préalable.

Les filtres sont ensuite lavés dans 5ml d'eau physiologique stérile à partir desquels une série de dilution est effectuée. Pour l'eau brute et l'eau saumâtre, 0,1ml de la solution de lavage d'une part, et 0,1ml de chaque dilution (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) d'autre part, sont étalés sur le milieu sélectif de Drigalski (AES, France). Pour l'eau brute, cet étalement est effectué directement à partir de 0,1ml d'eau même.

Les étalements sur boîtes sont incubés à 42°C pendant 18 à 24 heures. Les colonies lactose + sont isolées et ensuite mises en solution dans 5ml d'eau distillée stérile. Ces derniers servent d'une part à l'identification biochimique d'*E.coli* par l'utilisation du système API 20E (API system-Montalieu Vercieu, France) et d'autre part, pour ensemercer ces souches sur des géloses en pente Trypticase-Soja (AES, Combourg, France) pour leur conservation.

Parmi les 656 souches d'entérobactéries isolées et identifiées dans les 3 types d'eau, 300 souches d'*E.coli* sont utilisées pour réaliser l'étude du profil plasmidique. Ces souches sont choisies en tenant compte de leur contenu plasmidique (plusieurs plasmides) et leurs résistances aux antibiotiques (au moins une résistance). Ces deux conditions facilitent l'étude de l'évolution des plasmides dans le milieu extérieur et celle de l'impact du milieu extérieur sur les gènes codant la résistance aux antibiotiques par exemple.

II.3- Extraction de l'ADN plasmidique

La visualisation de l'ADN plasmidique après extraction est une technique de mise en évidence de la nature plasmidique d'un caractère donné. Le principe général des diverses techniques d'extraction plasmidique est basé sur la dénaturation alcaline. En effet, à des pH de l'ordre de 12,0 à 12,5, l'ADN chromosomique, sous forme linéaire, est dénaturé alors que l'ADN plasmidique sous forme surenroulée (CCC) reste intact.

La technique que nous avons employée est un protocole amélioré par ISH-HOROWICZ et BURKE (1981) selon la méthode de BIRNBOIM et DOLY (1979). Cette technique permet une extraction rapide de l'ADN plasmidique après lyse bactérienne en milieu alcalin.

On dispose au départ d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance (en bouillon BHI) distribuée dans des microtubes de 1,5ml (Eppendorf type 3810). Ces tubes sont centrifugés pendant 5 min à 10000g. Le culot est ensuite remis en suspension dans 100µl d'une solution de :

- glucose 50mM (Merck)
- EDTA 10mM (Sigma)
- TrisHCl 25mM (pH = 8) (Sigma)
- lysosyme 4mg/ml (Afilact)

Ceci dans le but de fragiliser les membranes bactériennes. Cette solution doit être froide et le lysosyme doit être ajouté au dernier moment.

Les bactéries sont ensuite lysées par addition de 200µl d'une solution de NaOH 0,2M (Merck), SDS 1% (BRL) et incubation à 0°C pendant 5 minutes. L'addition de 150µl d'une solution froide d'acétate de potassium 3M, pH = 4,8 (Prolabo) permet la séparation de l'ADN plasmidique par précipitation des débris cellulaires et de l'ADN chromosomique (préparation de la solution : à 60ml d'acétate de potassium 5M, on ajoute 11,5ml d'acide acétique glacial et 28,5 ml d'eau ; la solution qui résulte de cette préparation est de 3M pour le potassium et de 5M pour l'acétate). Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 0°C. Après une centrifugation pendant 5 minutes à 10000G, le surnageant renfermant l'ADN plasmidique est récupéré et transvasé dans un autre Eppendorf froid. L'addition d'un volume égal de phénol-chloroforme alcool isoamylique (25 : 24 : 1) (Sigma, Saint Louis, USA) permet d'éliminer les protéines, après une centrifugation de 5 à 10 minutes (selon les souches) à 10000G (étape de purification). La phase supérieure est transférée dans un nouvel Eppendorf froid, et l'ADN plasmidique est précipité par addition de deux volumes d'éthanol absolu à -20°C pendant une nuit ou à -80°C pendant 1h. Après une centrifugation de 30 minutes à 10000G, le culot lavé par 1,5ml d'éthanol à 70% puis séché au speed vac (Savant, DNA100), est remis en suspension dans 10µl de tampon T.E. (Tris-HCl 10mM, pH8, EDTA 1mM) contenant de la RNase pancréatique à 50µg/ml.

II.4- Electrophorèses en gel d'agarose

Les profils plasmidiques des souches étudiées sont déterminés par électrophorèse horizontale des extraits en gel d'agarose 0,7 à 0,8% (Seakem 6T6 Agarose) immergé dans le tampon d'électrophorèse selon MEYERS et al. (1976). L'agarose est dissout dans du tampon TAE (Tris-acétate 40mM, EDTA 1mM) (Sambrook et al. 1989) et porté à ébullition au four à

micro-ondes. Après avoir été refroidi à environ 50°C, celui-ci est coulé sur une plaque horizontale (20 x 20cm ou 15X 16cm), les puits de dépôt sont formés à l'aide d'un peigne. Le gel solidifié est alors immergé dans une cuve à électrophorèse contenant du tampon de migration (TAE). Les échantillons d'ADN ajoutés d'1/3 de leur volume d'une solution de bleu de bromophénol (50ml de glycérol, 8,75ml d' EDTA 0,4M pH8 et 50mg de bleu de bromophénol pour 100ml) sont déposés dans les puits et la migration se déroule pendant 5h à 7h (selon la cuve utilisée) à 5V/cm. Les gels sont ensuite colorés pendant 20 minutes dans une solution de bromure d'éthidium à 0,5µg/ml et rincés à l'eau distillée. La visualisation de l'ADN se fait par fluorescence en utilisant un transilluminateur UV puis il est photographié à l'aide d'un appareil Polaroid MP-3, muni d'un filtre orange et d'un filtre UV, chargé avec un film Polaroid 66.

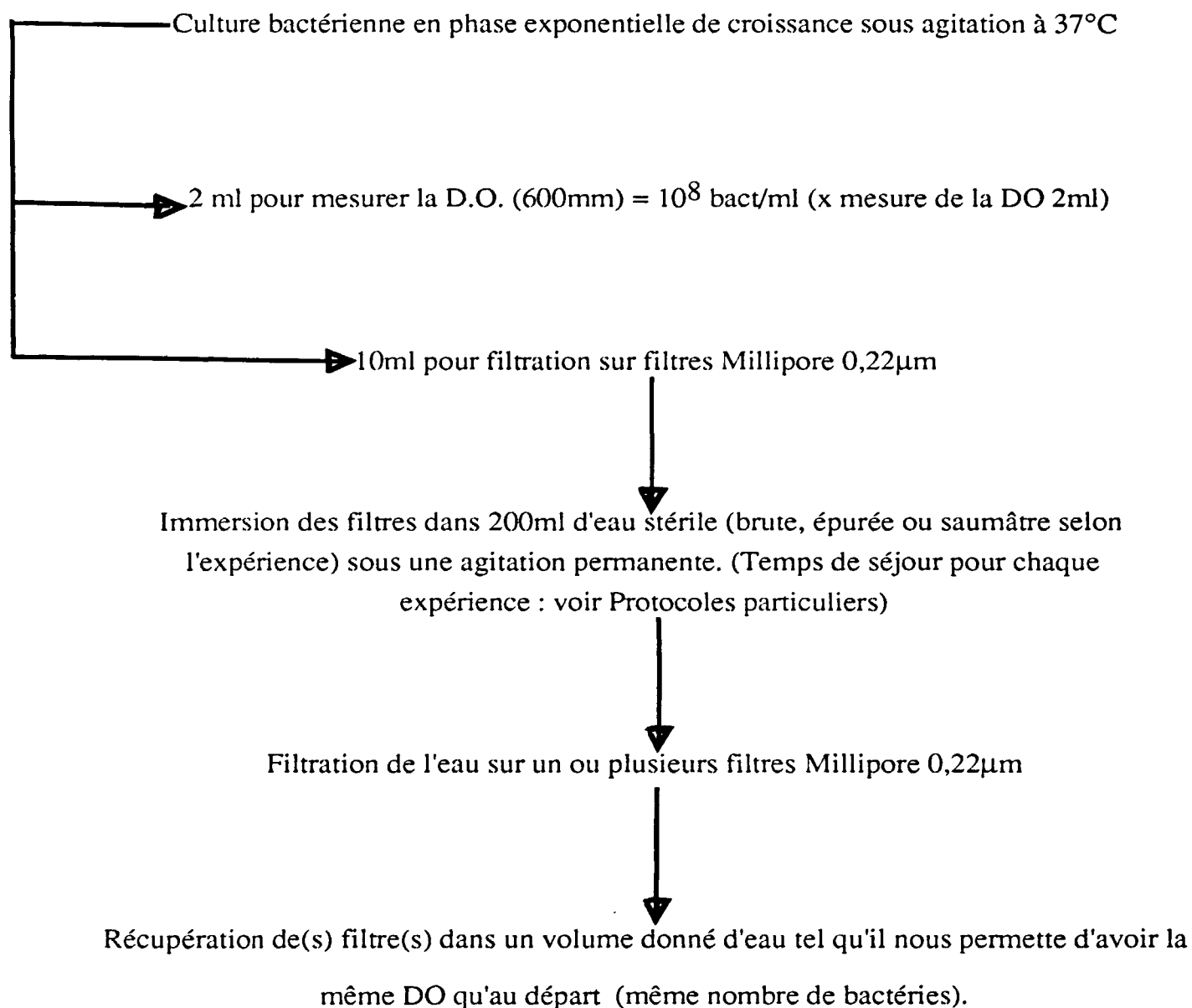
II.5- Analyse statistique

Les données sont saisies et traitées sur le logiciel Excel puis exploitées par Statgraphic pour effectuer des comparaisons statistiques entre les différents résultats obtenus.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

I- PROTOCOLE GENERAL

Le protocole suivi pour l'étude de l'évolution des plasmides (souche de référence et les 24 souches de l'environnement sélectionnées) est le suivant :



Après un certain temps de séjour dans les différents milieux, les bactéries sont étudiées par les approches suivantes :

*** Examen du contenu plasmidique**

L'examen du contenu plasmidique est réalisé par extraction selon la méthode de ISH-HOROWICZ et BURKE (1981) (chapitre Matériel et Méthodes) suivi d'une électrophorèse en gel d'agarose .

Le profil plasmidique de chaque échantillon est comparé à un témoin positif obtenu par une culture de la souche en phase exponentielle de croissance à 37°C sous agitation. Quelle que soit l'expérience réalisée, chaque échantillon est migré 2 fois.

*** Dénombrement des bactéries viables cultivables**

Les bactéries sont dénombrées par étalement de 0,1ml de suspension bactérienne à la dilution appropriée sur milieu MH en boîtes de Pétri incubées 18 à 24h à 37°C. Les résultats sont exprimés en CFU/ml (Colonie Formant Unité). Certaines de ces souches sont conservées en gélose (Trypticase-Soja) disposée en pente.

*** Etude de la stabilité plasmidique**

a) Isolement sur un milieu sélectif (souche de référence)

Le milieu sélectif est constitué d'une gélose MH additionnée d'une solution d'antibiotique.

Les solutions des antibiotiques employés sont préparées aux concentrations suivantes :

- Ticarcilline 250µg/ml
- Triméthoprim 20µg/ml
- Chloramphénicol 20µg/ml

Les bactéries sontensemencées par étalement et incubées à 37°C pendant 18 à 24h.

b) Faire des antibiogrammes (souches de l'environnement)

Les disques d'antibiotiques employés pour effectuer les antibiogrammes varient en fonction de la souche à étudier (voir tableaux 2a et 2b)

II- PROTOCOLES PARTICULIERS

a) Expériences sur la souche de référence

Les expériences sont effectuées avec divers temps de séjour :

- 24 à 48 heures
- 7 jours
- 7 et 14 jours
- 14, 30 et 47 jours

Pour chaque expérience, le(s) filtre(s) est (sont) retiré(s) de l'Erlenmeyer stérilement au bout de 24 heures. Cette précaution est faite pour éviter la déchirure de(s) filtre(s) au bout d'un certain temps à cause du frottement avec l'agitateur magnétique.

Le nombre et le profil plasmidique des bactéries obtenus au bout de chaque temps de séjour dans l'eau sont comparés à ceux obtenus en cultivant les bactéries dans du BHI sous les mêmes conditions.

b) Expériences sur les souches de l'environnement

Les temps de séjour employés pour chaque souche sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4

Souches	Temps de séjour (heures)			
	24	48	72	96
B17, B89, ES1, EB1	+	+		
B31, E60	+	+	+	
B36, B38, B87, B88, B94, B22, B5 E47, E77, E30, E69, E3, E33, E42, E102, E53		+	+	
B42, B92		+	+	+

B = souches isolées à partir de l'eau brute

E = souches isolées à partir de l'eau épurée

RESULTATS ET DISCUSSION

I. ETUDE DU CONTENU PLASMIDIQUE

I.1- Détermination du nombre de plasmides par souche

300 souches d'*E.coli* ont été isolées à partir d'eau brute, épurée et saumâtre, par l'incubation de filtres sur des boîtes contenant de la gélose de Drigalski suivie d'une identification par l'utilisation des API-20E. Ensuite, le contenu plasmidique de chacune de ces souches a été extrait selon la méthode Ish-Horowitz et Burke (1981), puis analysé par électrophorèse en gel d'agarose. L'électrophorèse monodimensionnelle ne présente que le nombre de bandes plasmidiques. Ce nombre peut rester identique ou inférieur au nombre réel de plasmides chez une souche bactérienne. Nous nous sommes contentés à présent du nombre de bandes visualisées sur le gel après électrophorèse et coloration en BET. Reste à vérifier et valider le nombre exact de ce dernier par la technique d'électrophorèse bidimensionnelle. Ceci est en cours.

Il faut souligner que nous sommes en présence de souches d'environnement et leurs contenus plasmidiques sont quelquefois plus difficiles à extraire, ceci est dû à une complication au niveau des membranes et/ou des procédures préalables pour les identifier (centrifugation, filtration...). Dans le but d'une confirmation des résultats d'extraction, chaque expérience a été effectuée deux fois par souche. Certains de ces résultats sont montrés sur la fig. 1. D'après les résultats obtenus pour les 300 souches (100 souches par nature de prélèvement), nous avons pu conclure que les distributions du nombre de bandes plasmidiques ne présentent pas de différence significative (test t de student $\alpha = 0,1$ et test de Kruskal Wallis) pour les souches provenant d'eaux brute et épurée. Le nombre des plasmides portés par les souches isolées de l'eau de mer offre une différence significative par rapport aux deux précédentes. Ces résultats sont montrés sur le graphique 1.

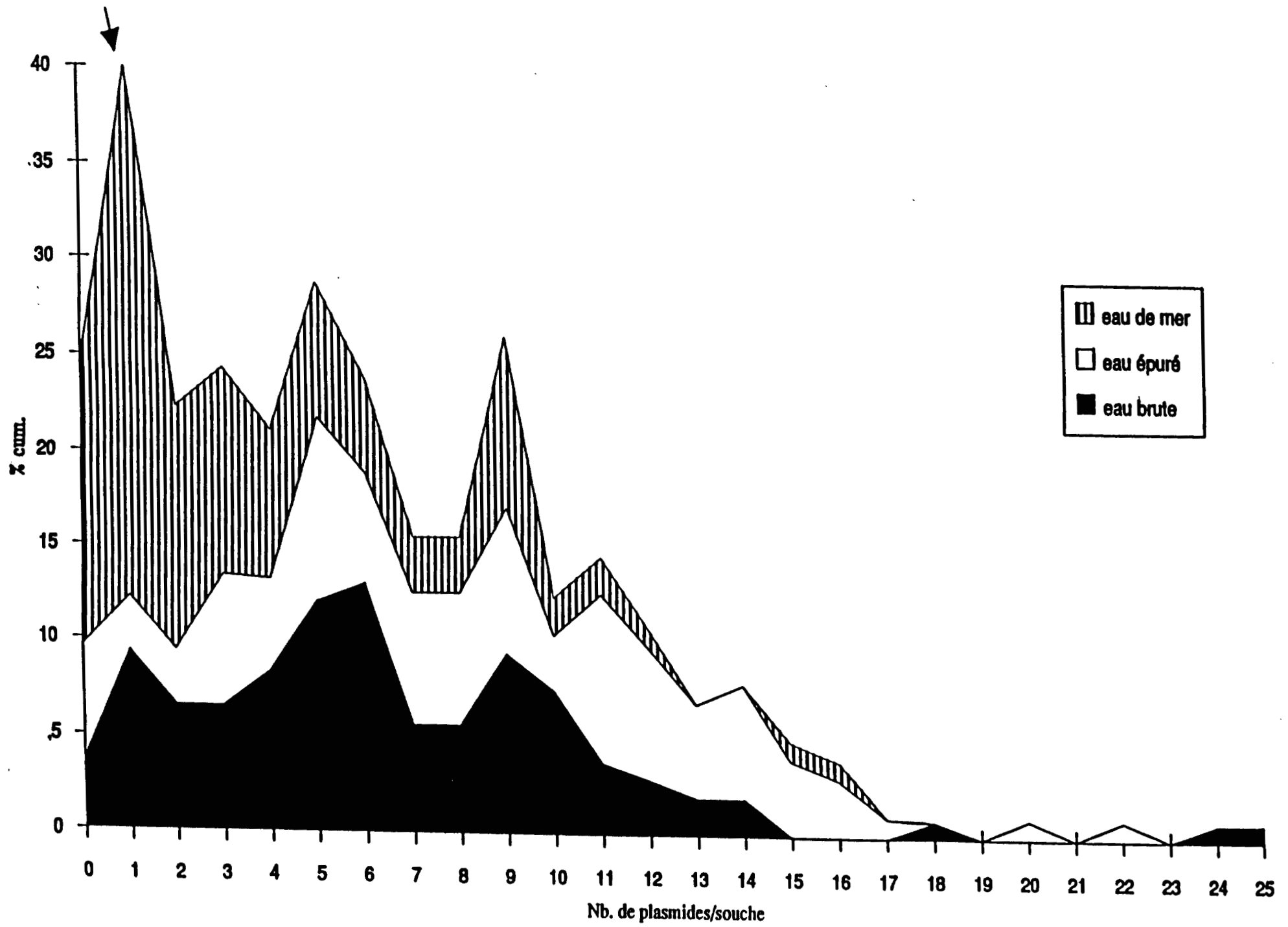
D'après la similarité entre le nombre de plasmides dans l'eau brute et l'eau épurée, on peut conclure que le traitement effectué en station d'épuration n'influence pas le dénombrement des plasmides. La diminution de ce dernier en arrivant à la mer peut être liée à certaines nouvelles conditions du milieu d'environnement, voire le stress dû à une salinité plus importante.

I.2- Détermination de la taille des plasmides

En partant de l'observation de MEYER et al. (1976), selon laquelle le logarithme de la distance de migration d'un plasmide dans un gel d'agarose est en fonction linéaire du logarithme de son poids moléculaire, les plasmides des 300 souches isolées d'eau brute, d'eau épurée et d'eau saumâtre ont été mis à migrer sur un gel d'agarose à 0,7% pendant 5 heures à 5V/cm en présence

Fig.1. L'examen du contenu plasmidique des souches *E.coli* isolées à partir d'eaux d'environnement par électrophorèse monodimensionnelle. Lignes : 2 à 4, les souches issues d'eau brute ; 6 à 8, les souches issues d'eau épurée ; 10 à 12, les souches issues de mer ; 1, 5 et 9, marqueurs de taille ; 13, *E.coli* C600 (témoin négatif).





Graph.1. Répartition du nombre de plasmides/souche.

d'autres plasmides de poids moléculaire connus. La taille des plasmides a été exprimée en kilobases et les résultats obtenus sont rapportés sur le graphique 2..

L'étude comparative de la taille des plus grands plasmides montre que dans l'eau brute et dans l'eau épurée, 42 à 44% des souches possèdent des plasmides mesurant plus de 56kb., tandis que dans l'eau saumâtre, seulement 15% des souches atteignent cette taille ; et 41% d'entre eux ont des tailles comprises entre 33 et 23,67 kb. Ces résultats sont rapportés sur le graphique 2. Ces résultats sont en bonne corrélation avec ceux obtenus au premier paragraphe. L'absence de plasmides de grandes tailles pourrait être l'origine de la diminution du nombre de plasmides en milieu salé.

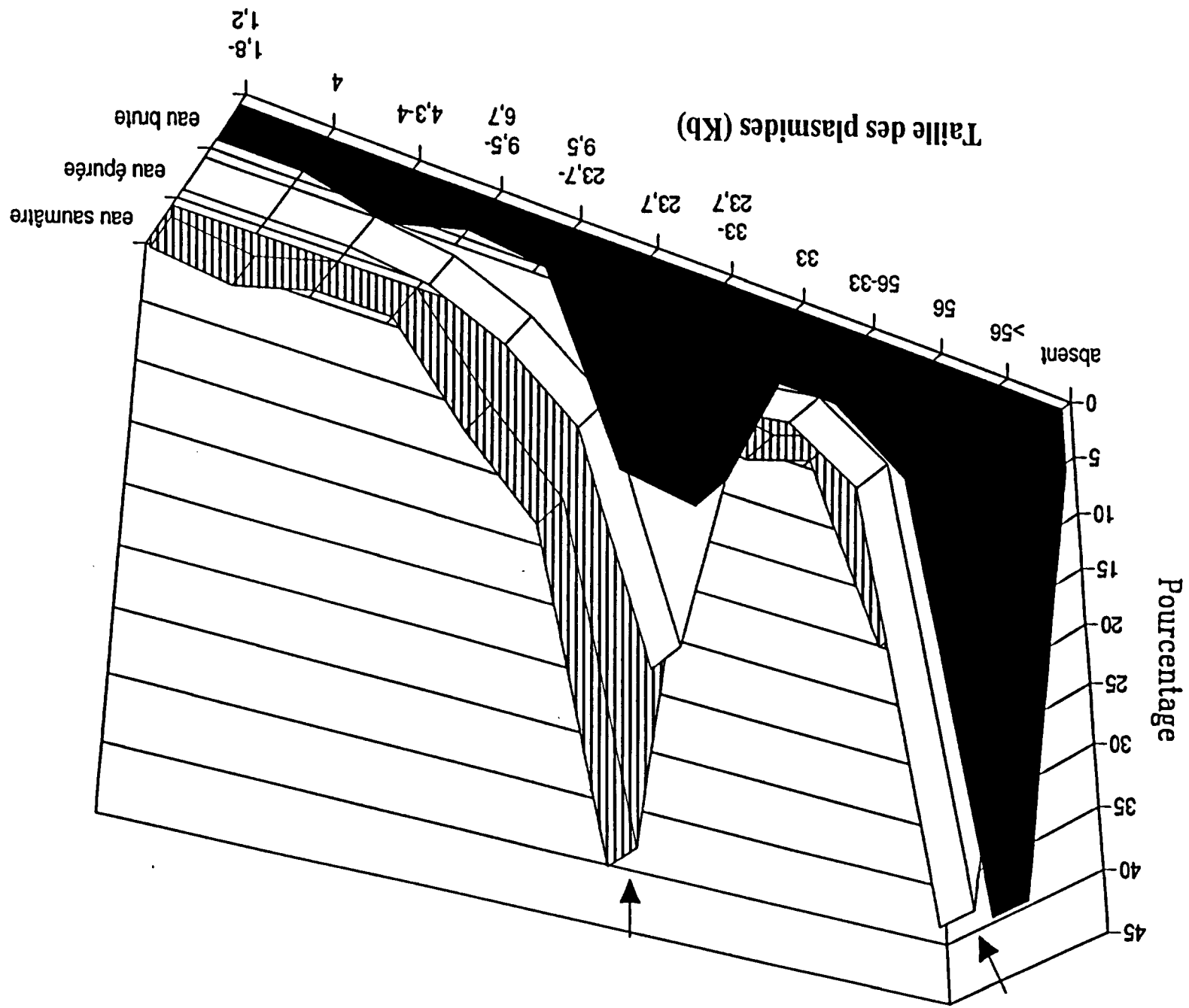
II. ETUDES D'EVOLUTION DES PLASMIDES

Ce paramètre a été étudié sur deux types de souches d'origines différentes : une souche *E.coli* K12 fabriquée au laboratoire contenant trois plasmides de référence, la souche HB101 (RP1, R388, pUB824) ; et les souches isolées de l'environnement portant des plasmides naturels.

Dans un premier temps, la souche HB101 (RP1, R388, pUB824) a été fabriquée par le croisement entre la souche HB101 et J5Nal (RP1), les transconjugants ont été sélectionnés sur un milieu gélosé contenant de la tétracycline à 20µg/ml et de l'acide nalidixique à 50µg/ml. Un des transconjugants a été croisé avec la souche J5Nal (R388) et les nouveaux transconjugants HB101 (RP1, R388) ont été isolés sur des boîtes contenant de la triméthoprime (20µg/ml) et de l'acide nalidixique (50µg/ml). L'étalement de ce mélange sur un milieu nutritif additionné de chloramphénicol (20µg/ml) et d'acide nalidixique (50µg/ml) a permis d'isoler la souche HB101 (RP1, R388, pUB824).

La souche contenant les trois plasmides de référence ainsi que les souches d'environnement hébergeant des plasmides naturels ont étéensemencées dans les eaux brutes, épurée et saumâtre pour une durée de 24h, 48h, 72h et 96h (souches d'environnement) et de 24h, 48h, 7j, 14j, 30j et 47j (souche de référence). Après chaque période, le contenu plasmidique et les caractères de résistance portés par ces souches ont été examinés selon les techniques décrites au chapitre "Matériel et Méthodes". Quelles que soient les conditions expérimentales, l'extraction a été effectuée sur environ 10^9 bactéries par ml et l'extrait plasmidique de ces souches cultivées en bouillon a été utilisé comme témoin positif de l'expérience, alors que l'extrait d'une souche sans plasmide (C600) sert de témoin négatif.

Les différents temps de séjours de la souche ayant les trois plasmides de référence dans les eaux brute, épurée et même saumâtre n'ont aucun effet sur le contenu plasmidique (fig.2 et 3) ni les caractères de résistance de ces souches. Sauf, qu'à partir d'une durée de 7j dans l'eau saumâtre, les



Graph.2. Distribution des plasmides de plus grande taille chez les *E.coli* venant de différentes eaux.

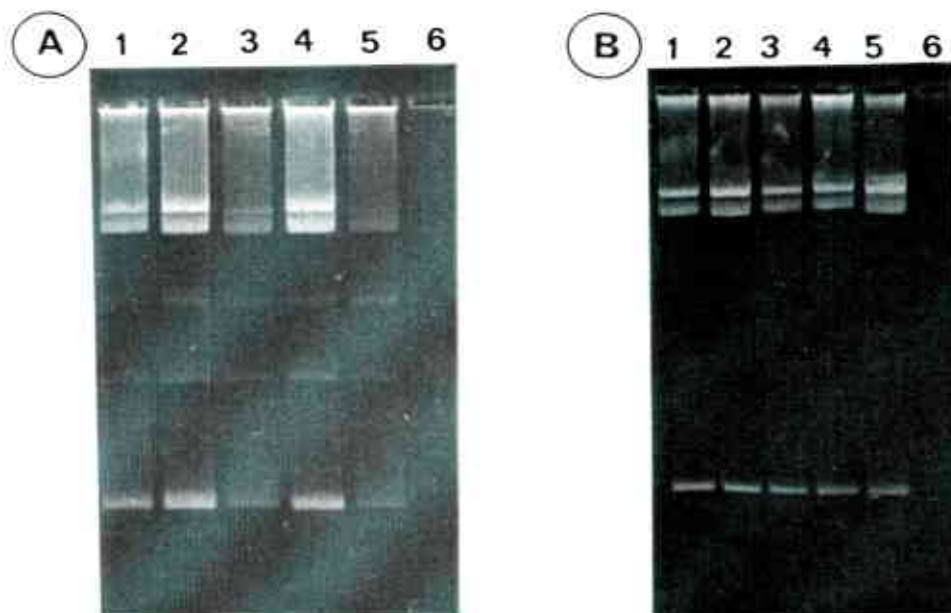


Fig.2. L'analyse des plasmides issus de la souche HB101 (RP1, R388, pUB824) par électrophorèse en gel d'agarose après différents temps de séjour en eau brute (A) et en eau épurée (B). Lignes (pour chaque photo) : 1, après 4h en bouillon 37°C (témoin positif) ; 2 et 4, après 24h et 48h en bouillon 25°C ; 3 et 5, après 24h et 48h dans l'eau 25°C ; 6, *E.coli* C600 (témoin négatif).

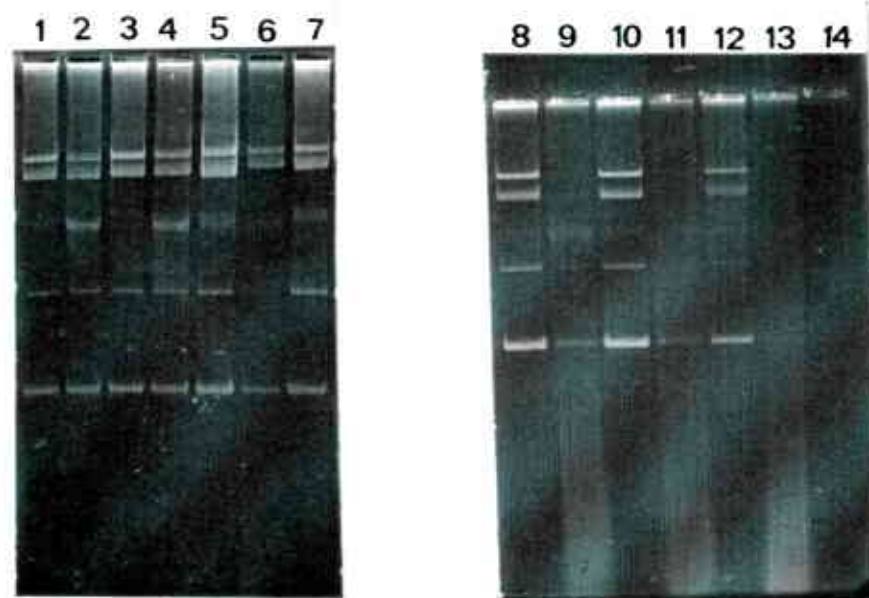


Fig.3. Le contenu plasmidique de la souche HB101 (RP1, R388, pUB824) sur deux gels d'agarose après différents temps de séjour en eau saumâtre. Lignes : 1, 3, 5, 8, 10, 12, après 24h, 48h, 7j, 14j, 30j et 47j en bouillon 25°C ; 2, 4, 6, 9, 11, 13, après 24h, 48h, 7j, 14j, 30j et 47j en eau saumâtre 25°C ; 7, après 4h en bouillon 37°C (témoin positif) ; 14, *E.coli* C600 (témoin négatif)

plasmides ont été plus difficiles à extraire et par conséquent, moins visibles sur le gel. Ceci est plus vrai pour le plasmide RP1 ayant une taille de 56kb. Peut-on lier ce problème à une modification au niveau de la paroi bactérienne dans un milieu plus salé, et/ou effectivement à une diminution du nombre de copies plasmidiques ou perte du plasmide chez certaines bactéries, surtout pour les grands plasmides comme RP1 ? Ceci reste à élucider ultérieurement.

Les résultats ont été similaires lorsque les souches d'environnement ont été mises dans les eaux brute, épurée ou saumâtre. Les caractères de résistance restent les mêmes quels que soient le milieu de séjour et/ou la durée de passage. A première vue, il n'y a donc pas la trace d'une perte, ni aucun réarrangement génétique pour pouvoir troubler les caractères de résistance. L'examen du contenu plasmidique de ces souches montre trois profils différents sur une totalité de 24 souches testées :

- 20 souches (83,3%) réagissent de la même façon que la souche de référence pour la période de manipulation, il n'y a pas de changement au niveau du contenu plasmidique après leurs séjours dans les eaux brute, épurée et saumâtre.

- 3 souches (12,5%) semblent avoir perdu une bande plasmidique de grande taille (supérieure à 56kb) après 48h de présence dans l'eau saumâtre, alors qu'elle réapparaît au bout de 96h. Ceci peut être dû à une réadaptation de la souche à son nouveau milieu d'environnement, cela reste à étudier de façon plus approfondie.

- 1 souche (4,2%) perd la bande supérieure (> 56kb) dès 48h de façon irréversible au moins pour une durée de 96h (durée de la manipulation). Certains de ces résultats sont montrés sur la fig.4. En se fixant sur l'idée de la disparition momentanée de grande plasmides en milieu salé pendant la durée de réadaptation des bactéries, il serait intéressant de prolonger le temps et voir ensuite la réapparition éventuelle de ce grand plasmide : dans ce cas là, cette souche serait ajoutée au paragraphe précédent et confirmerait l'hypothèse émise dans cette étude. Si cette grande bande plasmidique (> 56kb) représente un plasmide chez la souche étudiée par électrophorèse bidimensionnelle (étude en cours), cela ne peut être soit qu'un plasmide cryptique, soit qu'un plasmide codant pour d'autres caractères que la résistance aux antibiotiques.

D'après les résultats obtenus, et à condition que les bandes plasmidiques soient représentatives du nombre de plasmides portés par les souches étudiées, il est possible de conclure que le passage des souches hébergeant plusieurs plasmides de différentes tailles dans l'eau brute et l'eau épurée n'influence pas leurs contenus plasmidiques : aucun réarrangement, ni perte de plasmide. Mais dans l'eau de mer, il y a une diminution significative du nombre de plasmides par souche, ceci dû à une diminution des plasmides de grandes tailles. Cette disparition, en général momentanée et réversible, dépend du temps d'adaptation de la bactérie à ces nouvelles conditions.

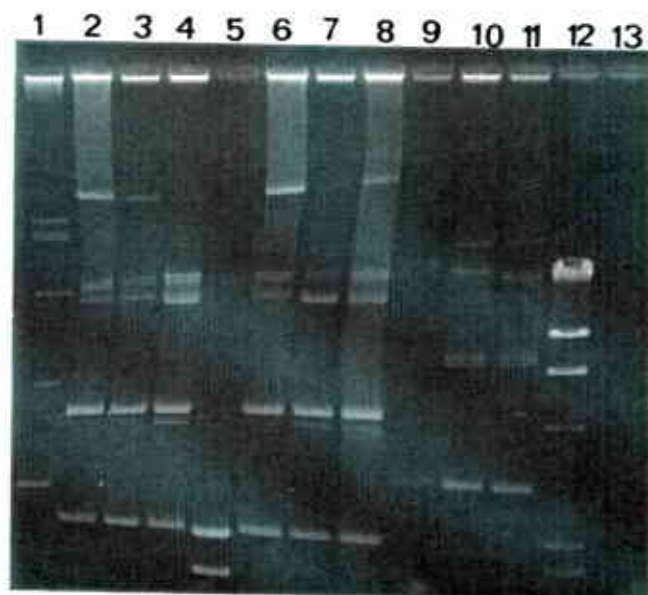


Fig.4. Le contenu plasmidique des souches d'environnement sur gel d'agarose après différents temps de séjour en différentes eaux. Lignes : 1, 5 et 12, marqueurs de taille ; 2 et 11, souches B42 et B88 en phase exponentielle de croissance ; 3 , 4 et 6, souche B42 en eau saumâtre (25°C) après 48h, 72h et 96h ; 7, souche B42 en eau épurée (25°C) après 72h ; 8, souche B42 en eau brute (25°C) après 72h ; 9 et 10, souche B88 en eau saumâtre après 48 et 72h ; 13, *E.coli* C600 (témoin négatif).

Ceci pose des problèmes réels en santé publique, lorsqu'on est en face de plasmides autotransférables portant les gènes de résistance aux antibiotiques ou la production de toxines.

BIBLIOGRAPHIE

BAYA A.M., BRAYTON P.R., BROWN V.L., GRIMES D.J., RUSSEK-COHEN E. and COLWELL R.R., 1986. Coincident plasmids and antimicrobial resistance in marine *bacteria* isolated from polluted and impolluted Atlantic ocean samples, *Appl. Environ. Microbiol.*, **51** : 1285-1292

BIRNBOIM M.C. and DOLY J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7** : 1513-1524

BOYER H.W. and ROULLAND-DUSSOIX D., 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.* **41** : 459-472

BURTON N.F., DAY M.J. and BULL A.T., 1982. Distribution of *bacteria* plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river, *Appl. Environ. Microbiol.*, **44** : 1026-1029

GLASSMAN D.L. and McNICOL L.A., 1981. Plasmid frequency in natural populations of estuarine microorganisms, *Plasmid*, **5** : 231

HADA H.S. and SIZEMORE R.K., 1981. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the north-western Gulf of Mexico, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41** : 199-202

ISH-HOROWICZ D. and BURKE J.F., 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning, *Nucleic Acids Research*, **9** : 2989-2993

MEYER J.F., NIES B.A., KRATZ J. and WIEDEMANN B., 1985. Evolution of Tn21-related transposon : isolation of Tn2425 which harbours IS161. *J. Gen. Microbiol.* **13**: 1123-1130

SAMBROOK J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS T., 1989. Molecular cloning laboratory manual., Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York

SMITH H.W., 1970. Incidence in river water of *Escherichia coli* containing R.factors. *Nature* (London) **288** : 1286-1288

YAMACISHI S., O'HARA K., SAWAI T. and MITSUHASHI S., 1969. The purification and properties of penicillin beta-lactamases mediated by transmissible R factors in *Escherichia coli*., *J. Biochem.* **66** : 11-20